

## ⑫ 公表特許公報(A)

平5-501543

⑬ 公表 平成5年(1993)3月25日

⑭ Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 予備審査請求	未請求 有	部門(区分)	3(2)
A 61 K 39/395 43/00 45/00 49/00	ADU	C 8413-4C 8415-4C 8415-4C 8415-4C				
G 01 N 33/53 33/535		A 8310-2J D 8310-2J				
// C 12 N 9/00		7823-4B				

(全 23 頁)

⑯ 発明の名称 診断薬または治療薬の抗体ターゲティング

⑰ 特 願 平2-508109  
⑱ 出 願 平1(1989)12月11日⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)6月11日  
⑳ 国際出願 PCT/US89/05441  
㉑ 国際公開番号 WO91/08770  
㉒ 国際公開日 平3(1991)6月27日

⑳ 発 明 者 ハンセン、ハンス・ジョン アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07090、ウエストフールド、ポイントン・786

㉑ 出 願 人 イムノメディックス・インコー アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07060、ウオーレン、シーボレイテッド、マウン・ベテル・ロード・150

㉒ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

## 要 求 の 範 囲

1. 診断薬または治療薬を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 哺乳動物に、ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を非経口的に注入する段階、但し、前記抗体は標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記部位に付着するのに十分な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に非経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1個の診断薬または治療薬を含む複合物を形成することが可能であり、前記複合物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断薬または治療薬に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、

前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、

前記段階を包含することを特徴とする方法。

2. 前記抗体-酵素接合体中の抗体が、腫瘍、感染もしくは寄生虫病、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、炎症性細胞、または、傷害を受けた正常細胞によって産生されるかまたはそれらに関連する抗原に特異的に結合する、請求項1に記載の方法。

3. 前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルコニダーゼ、または、エステラーゼである、請求項1に記載の方法。

4. 前記酵素が、デキストラナーゼ、セルラーゼ、または、グルコニダーゼである、請求項3に記載の方法。

5. 前記薬剤が診断薬である、請求項1に記載の方法。

6. 前記薬剤が、10-500 keV エネルギー範囲で放射するガンマ線放射線の放射性同位元素である、請求項5に記載の方法。

7. 前記薬剤が、磁気共鳴画像増強用の常磁性イオンである、請求項5に記載の方法。

8. 前記薬剤が治療剤である、請求項1に記載の方法。
9. 前記薬剤が、ベーターもしくはアルファー放射線の放射性同位元素、薬物、毒素、ホウ素付加因子、血管拡張剤、サイトカイン、光増感剤、または、放射線増感剤である、請求項8に記載の方法。
10. 前記非経口注入が、体腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、硬膜内、リンパ管内、筋肉内、関節内、皮下、または、カテーテル灌流経路によって実施される、請求項1に記載の方法。
11. 前記基質が低分子量化合物である、請求項1に記載の方法。
12. 前記基質が前記薬剤のグルクロニド接合体である、請求項11に記載の方法。
13. 前記基質がポリマーである、請求項1に記載の方法。
14. 前記基質が、デキストラン、アミノデキストラン、カルボキシメチルセルロース、または、ポリペプチドである、請求項13に記載の方法。
15. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン担体を含み、この担体に、少なくとも

- 1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この担体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デキストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項13に記載の方法。
16. 前記基質-薬剤接合体が非基質性ポリマーを含み、このポリマーに、少なくとも1つの基質オリゴマーが結合され、このオリゴマーに、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されている、請求項13に記載の方法。
17. 循環系からの抗体-酵素接合体のクリアランスまたは標的部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴造影増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。
18. 循環系からの基質-薬剤接合体のクリアランスまたは標的部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴造影増強剤、または、その他の標的に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。
19. 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

20. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための二重滅菌注射製剤であって、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクル中に、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を含有する、第1の滅菌注射液、但し、前記抗体は標的部位の少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1及び第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

21. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングする

ための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、但し、前記抗体は、その標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

22. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、磁気共鳴造影増強

剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項21に記載のキット。

23. 前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

24. 前記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

25. 段階(a)で提供される前記抗体-酵素接合体が、標的部位に存在する前記抗原に対して特異的な第1の結合部位と、酵素活性を妨害しない、前記酵素上のエピトープに対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位で前記酵素に非共有的に結合されて前記抗体-酵素接合体を形成する、請求項1に記載の方法。

26. 標的部位に治療剤または診断剤を<sup>2</sup>ターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤であって、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解された、

に、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

28. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項27に記載のキット。

29. 診断剤または治療剤を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、

ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌注射剤、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1と第2の注射剤を含むことを特徴とする製剤。

27. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、並び

に、前記酵素に対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体または抗体フラグメントを提供する段階、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に経口的に注入する段階、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記局在化抗体が前記酵素に結合して前記抗体-酵素接合体をその場で形成するように、前記酵素の酵素活性有効量を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、

(d) さらに、前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記産物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非

標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量は内在しない、前記段階を包含することを特徴とする方法。

32. 前記抗体-酵素接合体中の抗体または抗体フラグメントが、腫瘍、感染もしくは寄生病巣、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性結核、または、傷害を受けた正常細胞によって産生されるかまたは関連する抗原に特異的に結合する、請求項31に記載の方法。

33. 前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エステラーゼである、請求項31に記載の方法。

34. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1個のホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項31に記載の方法。

35. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン塩体を含み、この塩体に、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この塩体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デ

キストランまたはカルボキシメチルセルコースオリゴマーに結合されている、請求項31に記載の方法。

36. 前記哺乳動物がヒトである、請求項31に記載の方法。

37. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含有する第1の滅菌注射液、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記酵素は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第3の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成し、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を

み、前記基質-酵素接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、また、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1、第2および第3の注射液を含むことを特徴とするキット。

38. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含有する第1の滅菌容器、

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含有する第2の滅菌容器、並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤

接合体を含有する第3の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、前記第1、第2および第3の容器を含むことを特徴とするキット。

39. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項38に記載のキット。

## 明 細 書

## 診断薬または治療薬の抗体ターゲティング

## 発 明 の 背 景

本発明は、抗体-薬複合体および別個の可溶性基質-薬剤複合体を用いて、抗体のターゲティング能力を高める方法に関する。ここに、標的酵素は、少なくとも1種の治療薬または診断薬を保持する可溶性基質を、その薬剤を含む産物に変換するのを触媒する。従って、この薬剤は、標的位置に蓄積し、有効な治療ないし診断を行なうことができる。前記の方法は、抗体が選択的に結合できる部位に、あらゆる種類の薬剤を、ターゲティングするのに有効である。その使用の中には、腫瘍、感染病巣、フィブリン凝血、心筋梗塞、非腫瘍細胞、傷害を受けた正常細胞、動脈硬化プラーク、リンパ球自己反応クローン等の顕像化および治療が含まれる。

抗体もしくは抗体フラグメントを、放射性同位元素、薬剤または薬物に結合させ、それによって、診断用もしくは治療用物質を、腫瘍または病巣部位にターゲティングすることはよく知られている。このような方法を用いる場合の主な障害は、抗体に、十分な量の治療薬または診断薬を負荷することが困難であ

ることであった。さらに厄介なことは、抗体を、治療薬または診断薬を負荷しすぎると、生体の拒絶反応を招き、その抗体複合体の破壊をもたらすことである。

細胞傷害性薬剤を抗体に結合させて目指す治療効果を達成するやり方はよく知られている。例えば、メトトレキサート(MTX)を抗体に結合させると、若干の選択的細胞毒性が観察されることは知られている。このような複合体の細胞毒性を、細胞傷害性薬剤の負荷量を増大することによって強化することは望ましい。しかしながら、1個の抗体に、個々の薬剤分子を、多数結合させることは、結局、その免疫原性を低下させることとなるが、一方、その効果は、約10個以上の薬剤分子が負荷されると観察される。

また、薬剤を高分子担体に結合させ、次に、このものを抗体に結合させるという提案も為されてきた。これは、より多数の薬剤分子を、標的部に搬送できるという利点を持つ。高分子担体としてポリリジンをを用いることが、Eppelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1867-1870, 1978によって報告されている。この著者らの所見によれば、1個の担体あたり約13個のMTXしか負荷することができず、免疫反応性は低かった。

さらに、この高分子の高いアミン含量(大部分、荷電されたアンモニウム基の形で存在する)のために、複合体は、正常細胞に付着することとなり、細胞毒性作用の選択性を損なう。

Reisler アメリカ国特許第 4,046,722号は、次の抗体複合体を開示しており、この複合体においては、複数の細胞傷害性薬剤分子が分子量 5,000-500,000 の高分子担体に共有的に結合し、かつ、この負荷担体は、ペンダントアミンまたはカルボキシル基にランダムに付着することによって、抗体に共有的に結合している。Gieseら、J. Natl. Cancer Inst., 61:657-676, 1978は、抗癌療法に有効なその他の抗体結合型細胞傷害性薬剤について開示している。Sklarら、アメリカ国特許第 4,191,714号は、メトトレキサートを負荷したアミノデキストランを抗体に部位特異的に付着させることを開示している。

標的化中性子活性化放射線療法は、例えば、Goldschlagerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:560 (1984); Hawikkuら、J. Med. Chem., 15:449 (1972); Goldschlager, アメリカ国特許第 4,332,647号、第 4,348,376号、第 4,361,544号、第 4,469,457号、第 4,464,744号、第 4,469,459号および第 4,469,561号、並びに関連の係出願であるアメリカ国特

許出願第 609,607号(5-14-84出願)および第 612,989号

(7-14-84出願)に記載されており、これらすべての開示を、参照として主明細書中に含めることとする。

前記の参考文献は、特に、ホウ素-10含有付加因子(Addends)を、例えば、カルボラン(例えば、フェニルジアゾニウムイオンに結合したもの)と抗体との結合を用いて抗体複合体中に取り込む方法を開示している。この複合体は、比較的小数のホウ素-10原子を取り込むのに好適なものである。通常、10から120個のB-10原子を、免疫反応性や回収率の量が、受け入れ不可能となるほど低くなる以前に、カルボラン-フェニルジアゾニウム複合法を用いて1gに付着させる。有効な治療のためには、多数のB-10原子を腫瘍部位にターゲティングできることが望ましい。

したがって、ターゲティング抗体に放射線剤を過剰に負荷することによって免疫反応性を喪失させることなくおよび/又は免疫原性を誘発しつつ、十分量の治療薬または診断薬を標的部に付着することが可能な抗体ターゲティング法に対する要求が引き続き存在している。

発明の目的

本発明の一つの目的は、ターゲティング事象を増強することによって、抗体のターゲティング能力を増強する方法を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、癌、感染病巣、または例えば心筋梗塞のようなその他の病巣の診断および／または治療に有効な薬剤を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、抗体に高度に負荷する必要なしに、治療薬または診断薬を標的部位に高度に蓄積させることである。

本発明のさらに別の目的は、抗体上にホウ素原子を負荷する必要なしに、熱中性子活性化放射線療法用の腫瘍および病巣に対して有効な治療剤として機能するのに十分多数のホウ素原子を標的にする方法を提供することである。

本発明のその他の目的は、以下の論議に照らして見れば、当業者には自明であろう。

発明の要約

本発明の上記ならびにその他の目的は、診断薬および／または治療薬を標的部位にターゲティングする方法を提供すること

によって達成されるが、この方法は下記の段階を包含する：

(a) 抗体-酵素接合体のターゲティングおよび酵素活性に有効な量を、哺乳類に経口的に注入する段階。但し、この抗体は、標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性を持つ。

(b) 抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、哺乳類の循環系から實質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、可溶性基質-薬剤接合体を、それが標的部位に付着するのに有効な量を、その哺乳類に経口的に注入する段階。但し、この接合体は、該酵素によって変換されてその薬剤を含む産物を形成し、この産物が、効果的な治療および／または診断のために標的部位に蓄積する。また、基質-薬剤接合体は、該酵素の基質を含む、少なくとも1種の診断剤または治療剤に結合されている。また、ここに、上記酵素、または、該基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、投与経路に沿う非標的部位において、または、該基質/薬剤接合体の生体内分布において、上記薬剤のターゲティングおよび集積を妨げるほどの量としては、その哺乳類に内在しない。

本発明はまた、前記の方法を実施する際に使用される、試薬、

滅菌注入製剤およびキットを提供する。

詳細な説明

従来の技術は、治療剤または診断剤を直接抗体に、または、抗体に結合した担体に結合させる方法を開示している。薬剤を抗体に結合させることに伴う問題として、単純結合、免疫反応性の喪失、免疫原性、抗体上への該薬剤の不十分な負荷、および標的部位への該薬剤の不適切な付着がある。本発明は、抗体-酵素接合体と、別個の基質-薬剤接合体とを用いることによってこのような問題を解決するものであり、これによって、抗体は、診断剤または治療剤を該抗体上に負荷する必要なしに、目的部位にターゲティングすることができる。

本発明の診断剤または治療剤を標的部位にターゲティングする方法は、先ず、ターゲティングおよび酵素活性に効果的な量の抗体-酵素接合体を哺乳類に経口的に注入すること、及びその接合体が、標的部位に局在し且つその哺乳類の循環系から實質的に除去されるのに十分な時間が経過するのを待つこと、によって達成される。本発明方法の次の段階は、標的部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を、その哺乳類に経口的に注入することである。この接合体は、その酵素に

より該薬剤を含む産物に変換されることができ、この産物が標的部位に蓄積し効果的な治療または診断を実現する。この基質-薬剤接合体は、少なくとも1種の診断剤または治療剤に結合された該酵素の基質である。

この抗体-酵素接合体の抗体成分は、ターゲティング部分であって、この接合体を、標的部位に存在する少なくとも1つの抗原に選択的に結合させる働きをする。従って、この接合体の酵素成分は、標的部位に局在する。一旦、非ターゲティング接合体が實質的に血流から除去されたならば、基質-薬剤接合体を注入する。この基質-薬剤接合体は、無視できるほどの僅少量以上の抗体-酵素接合体または同様の作用を持つ内在性酵素と、標的部位に向かう途中で出会ってはならない。

しかしながら、この基質-薬剤接合体が標的部位に達すると、この接合体は、該酵素によって、診断剤または治療剤を含む産物に変換される。この酵素は、基質-酵素接合体の多数の分子またはサブユニットを変換し、多数の産物を標的部位に集積しやすい形で運搬する。これは、標的部位と、組織を取りまく体液または標的部位自体に存する他の抗原含有媒体との分配が、蓄積に好都合であるためである。従って、この酵素は、抗体の

ターゲティング能力を増幅するが、薬剤を、ターゲティング抗体に結合させることを必要としない。また、薬剤は、標的部位に蓄積し、そこで診断または治療作用を実施することができる。

別様に断わらない限り、本明細書中「抗体」という用語の使用は、抗体フラグメントを含めること、従って、「抗体/フラグメント」という用語と等しいものであって、この説明では両者は相互に交換的に用いられる。抗体は、いずれのクラスの、例えば、IgG, IgM, IgA, IgD, IgE の免疫グロブリン全体でもよいし、二重もしくは多重抗原またはエピトープ特異性を備えたハイブリッド抗体でもよいし、ハイブリッドフラグメントを含むフラグメント、例えば、 $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $F(ab)$ ,  $F(ab)$  などでもよい。

抗体は、抗血清調製物を含み、好ましくは、アフィニティー精製のもので高い免疫反応性をもつもの、例えば、結合定数が少なくとも約  $10^7$  l/mole、好ましくは少なくとも約  $10^8$  l/mole の免疫反応性をもつもの、高い免疫特異性をもつもの、例えば、少なくとも約 40%、好ましくは少なくとも約 60%、さらに好ましくは約 75-95% の免疫特異性をもつもの、他の組織抗原との交差反応性が低いもの、例えば、約 30% 以下、好ま

しくは約 15% 以下、さらに好ましくは約 5% 以下の交叉反応性をもつものである。この抗血清は、通常の方法によって、アフィニティー精製することができる。例えば、抗原を、例えばセファデックスを充填したクロマトグラフィーカラムに結合させ、このカラム中に抗血清を通過させ、それによって特異抗体を保持し、その他の免疫グロブリンや汚染物質を分離除去し、次に、カオトロピック剤による溶出によって精製抗体を回収する、また、必要に応じてさらに精製する。

モノクローナル抗体もまた、本発明方法に使用するに適合であり、それらの高い特異性のために好ましい。モノクローナル抗体は、現在では通例法となった手順、すなわち、免疫原性抗原調製物での哺乳類の免疫、免疫リンパもしくは脾臓細胞と不死化骨髄腫細胞系との融合、および特異的ハイブリドマクローンの単離によって容易に調製される。モノクローナル抗体の、さらに特殊な調製法、例えば、種間融合 (interspecific fusion) や、高度可変領域の、遺伝子工学操作なども排除されない。この理由は、本発明方法の有効性に影響するものは主に抗体の抗原特異性にあるからである。

抗体フラグメントは、例えば、特に、アメリカ国特許第

4,331,647号に開示されている通例の方法によって、免疫グロブリン全体をペプシンもしくはババインで消化することによって作ることができる。

標的部位は、癌、感染および寄生病巣、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、傷害を受けた正常細胞、非腫瘍細胞、およびリンパ球自己反応性クローンであってもよいが、それらに限定されない。

腫瘍または、ウィルス性、細菌性、真菌性、寄生生物性感染を含む感染病巣によって産生されるかまたはそれらに伴うマーカーに特異的に結合する多くの抗体および抗体フラグメント、並びに、そのような微生物と関連する抗原や産物については、特に、Harrisら、アメリカ国特許第 3,927,193号；Goldenberg, アメリカ国特許第 4,331,647号、第 4,348,376号、

第 4,351,544号、第 4,468,457号、第 4,444,744号、

第 4,469,453号および第 4,469,581号、並びに、関連する係属出願アメリカ国特許出願第 169,607号および第 611,193号に開示されている。これらすべての開示を、参照としてそっくりそのまま本明細書中に含めることとする。

抗フィブリン抗体は、この分野においてはよく知られている。

心筋梗塞を標的する抗体は、例えば、Heber, アメリカ国特許第 4,331,645号に開示されており、この開示内容を、参照としてそのまま本明細書中に含めることにする。正常組織もしくは器官を標的する抗体は、例えば、アメリカ国特許第 4,715,210号に開示されており、その開示内容を、参照としてそのまま本明細書中に含めることにする。抗フィブリン抗体は、この分野では、動脈硬化プラークやリンパ球自己反応性クローンに結合する抗体としてよく知られている。

一般に、抗体は通常、この分野で周知の多数の慣用技術を用いて、いかなる抗原に対しても生じさせることが可能である。診断的または治療的関心の対象である哺乳類の体内のある部位に十分な濃度で見出される抗原に対して、抗体をターゲティングする方法は、いかなる方法であれ、本発明の方法に使用される抗体-酵素接合体の製造に用いることができる。

さらに、標的部位に存在する抗原に対して特異的な少なくとも1つの結合部位と、抗体-酵素接合体の酵素成分に対して特異的な別の少なくとも1つの結合部位とをもつ二重特異性抗体/フラグメントは、本発明方法に用いることができるということにも注目すべきである。このような抗体は注入前に酵素と結合

することができ、これによって酵素を共有的に抗体に結合させる必要を回避することができる。あるいは、その抗体を注入し、標的部位に局在させ、非ターゲット抗体が哺乳動物の循環系から実質的に除去された後に、局在化した抗体に到達して該抗体と結合するのに十分な量の酵素がその場で (in situ) 抗体-酵素複合体を形成することが可能な量および経路で該酵素を注入することができる。

二重特異性抗体は、様々な通例法によって作ることができる。例えば、ジスルフィド切断によって、全 Ig G の混合物または好ましくは、 $F(ab')_2$  フラグメントの混合物の再構成によって、1種以上のクローンを融合して、1種以上の特異性を持つ免疫グロブリン鎖を生成するポリオマーを形成することによって、および、遺伝子工学によって調製することができる。二重特異性抗体は、酵素上の1個以上のエピトープに結合してもよいが、酵素活性を妨げる部位に結合してはならない。

本発明に用いられる酵素は、実質的に可溶な基質-基質複合体を生成して、診断剤および/または治療剤を含む標的部位に蓄積する産物を形成することができなければならない。上記酵素および同様の基質特異性を持つ酵素のいずれもが、基質-基

質複合体の投与経路または生体分布において、その哺乳類にとって内在性であってはならない。さもなければ、その薬剤は標的部位以外の部位で放出され、これは通常、常にそうだというわけではないが、薬剤の診断または治療作用の効率を妨げたり不安定なものにするだろう。

原則として、酵素は、抗体に結合して基質-基質複合体を産物に変換できるものであればどのような種類の酵素でもよいが、ただし、これにも前記の注意は適用される。プロチナーゼ類、グリコシダーゼ類、ニステラーゼ類などが、適当な条件で本発明に使用できる一般的種類の酵素のすべてである。適当な酵素のさらに特定の例としては、グルクロニダーゼ、ペクターグルコシダーゼ、ペクターラクタマーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、フラクターゼ、アミノペプチダーゼ、リゾチームなどであるが、これらに限定されるものではない。

酵素は、選んだ基質-基質複合体の種類の機能として選択される。例えば、基質としてデキストランを選ぶことは、酵素としてはデキストラナーゼを使用することと結びつく。同様に、セルラーゼは、セルロース基質と共に使用される。基質-基質複合体としてグルクロニドを用いることは、酵素としてグルクロ

ニダーゼを使用することと結びつく、などである。

抗体-酵素複合体をその場で形成する方法とは別に、酵素を抗体に共有的に結合させることは有利である。すなわち、直接に結合させるか、または、短いもしくは長いリンカー部分を介して、または、抗体および/または酵素上の1個以上の官能基、例えばアミノ基、カルボキシル基、フェニル基、チオール基、ヒドロキシル基を介して結合させることは有利である。通常用いられる各種リンカー。例えば、ジソチオシアネート類、ジソチオシアネート類、ビス(ヒドロキシスクシンイミド)エステル類、カルボジイミド類、マレイミド-ヒドロキシスクシンイミドエステル類、グルタルアルデヒドなどが使用できる。

単純な方法は、グルタルアルデヒドの存在下に抗体を酵素と混合し、抗体-酵素複合体を形成することである。最初の共役結合は、例えばボロハイドライド還元による第二アミン生成によって安定化させることが可能である。この方法は、通常、例えば免疫組織化学やイムノアッセイに使用されるペルオキシダーゼ-抗体複合体の調製に用いられる。ジソチオシアネートまたはカルボジイミドを、グルタルアルデヒドの代わりに用いてもよい。

さらに選択的な結合は、異種二官能性リンカー、例えばマレイミド-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いて達成できる。このものと酵素を反応させると、その酵素上にアミノ基を誘導する。この誘導体は、さらに、例えば遊離スルヒドリル基を持つ抗体 Fab フラグメント（または、もっと大きなフラグメントもしくは無傷の免疫グロブリンで、それらに、例えば Tisel 試験によってスルヒドリル基を結合させたもの）と反応させることができる。

酵素を、抗原結合部位よりはるかに離れた部位で抗体に結合させるのが有利である。このことは、例えば、前記したように、切断された遊離スルヒドリル基に対する結合によって達成される。もう一つの方法は、あらかじめ炭水化物部分を酸化した抗体を、少なくとも1個の遊離アミノ基を持つ酵素と反応させることである。これによって、最初の共役結合（イミン）結合が得られる。この結合は、例えばボロハイドライド還元により第二アミンに還元して安定化し、最終複合体を形成するのが好ましい。

複合体の大きさの問題のため、普通は、1個の抗体を1個の酵素分子に結合させるのが好ましい。しかしながら、複数の抗



体フラグメント、例えば $F(ab')$ もしくは $F(ab)$ フラグメントを単一の酵素に結合させて、抗原性的に對する、その結合親和性または結合効率を増大させることも有利であろう。あるいは、酵素があまりに高いものでない場合には、複数の酵素分子を単一の抗体もしくは抗体フラグメントに結合させて、接合体の代謝回転を増し、標的部位における診断剤または治療剤の付着速度を増進させることが有用であろう。1種以上の酵素と抗体との接合体もまた、それが標的部位に到達することができ、あまりに迅速に除去されない限り使用できる。種々の大きさの接合体混合物、または、凝集体を含む接合体もまた、図面に記した注意が守られる限り使用できる。

さらに、抗体-酵素接合体を、放射性同位元素または磁気共鳴画像増強剤で標識したり、それらに結合させたり、または、接合できるように改変したりすることもできる。これによって、哺乳類の循環系からの該接合体のクリアランスを監視したり、基質-薬剤接合体の投与前に、該接合体が標的部位に十分局在しているかどうかを確認することができる。あるいは、その接合体に、標識、例えば放射性標識、蛍光標識などを付加することもできる。これによって、血液や尿のような体液中に該接合

および診断剤は、例えば毒素、抗生物質もしくは化学療法剤、放射性同位元素、常磁性イオン、ホウ素付加因子、サイトカイン、光増感剤、放射増感剤、血管拡張剤などである。

基質-薬剤接合体は、投与および標的部位への搬送のために可溶性でなければならない。さらに、このものは標的に適し、接合体よりも、その部位に誘引されるのに実質的により好ましい分配係数をもつ薬物に交換されなければならない。本明細書中で使用する「可溶性」という用語は、接合体が流体中に投与され、その流体によって標的部位に運搬される該流体中に、診断的または治療的に有効量の接合体を標的部位に運搬させるに十分な強度に溶解し得るという意味である。一般に、投与は静脈内または動脈内点<sup>(1)</sup>滴によって血流中に行なわれ、接合体は血清に溶解し、好ましくは、血清の水相によってほとんど運ばれるほど十分な親水性を持ち、比較的容易に血管壁を通過して細胞間液に拡散することが、そのようなことが必要な場合には、望ましい。

もちろん、標的部位が循環系にある、心臓固着化または動脈硬化プラークの固着化もしくは治療等の場合には、水溶性／脂溶性は、基質-薬剤接合体が酵素によって切断されて、標的

体を検出したり、定量化したりすることが可能となり、したがって、ターゲティングおよび／またはクリアランスを測定および／または推定することが可能となる。

18 1110 使用のために蛋白質を標識するのに適当な通常の放射性標識法のいずれもが、一般に、抗体-酵素接合体を標識するのに好適であり、また、基質-酵素接合体を標識するのにも好都合であることが多い。このことについては下記に述べる通り、これは、例えば1-131I、1-123Iによる直接標識によって、例えば1-113IまたはCuイオンなどによる金属化によって、慣用技術によって、または、放射性金属もしくは常磁性イオンに対するキレート剤を結合することによって達成できる。そのようなキレート剤、および、その抗体への結合方法は、当業者にはよく知られており、並びに、特に、例えば前記Goldbergerの特許およびChilcote, J. Soc. Med., 26:223 (1933)に開示されている。

基質-薬剤接合体は基質を含み、この基質は抗体-酵素接合体に局在する酵素によって薬物に変換され得る。薬剤は診断剤または治療剤であって、ある特定部位にたいする薬剤ターゲティングは、その効能にとって有利となろう。そのような治療剤

部位により好適に分配する<sup>(2)</sup>薬物生ずることに伴う血清可溶性の低下ほどには重要ではない。本発明のターゲティング機構を特徴づけるものは、まさに該薬剤からのこのような分配であって、一旦、基質-薬剤接合体がターゲティング抗体-酵素接合体の酵素成分によって作用されると、その薬剤は、基質-酵素接合体が酵素のない場合に薬物するよりもかなり大量標的部位に薬物する。そのように薬剤の切り離しが行なわれることである。これについては、いくつかの一般的な例や、種々の種類についてのさらに詳細な説明に照らしてみれば、さらに分かりやすいであろう。

本発明の基質-薬剤接合体の一般的な製造方法は、少なくとも1種の治療剤または診断剤を基質に共有的に結合させることを包含する。

抗癌療法に有用な、ある種の細胞傷害性薬剤は、比較的血清に不溶である。非接合体のものにはまったく有毒であるものもあるが、接合体に変換すると毒性が相当に減少する。比較的脂溶性の薬剤をより可溶性の接合体、例えばグルクロニドに変換することは、血清の水相に對するその溶解性を増し、静脈、動脈、毛細血管の細胞壁からの透過性を高め、腫瘍を取りまく

細胞間液への到達を向上させる。実際、ある種の有毒物質、例えば芳香族もしくは脂環式アルコール類、チオール類、フェノール類、アミン類のような物質を肝臓においてグルクロニド類に変換することが、それらの物質に対する生体の解毒法であり、それによってまた尿中に排泄しやすくなる。

薬剤はグルクロン酸に結合され、グルクロニドを形成し、これが接合体を溶解する。結合は、通常、薬剤のヒドロキシル基、チオール基またはアミン基に対して行なわれ、このグルクロン酸のアルデヒド炭素と、アセタール、チオアセタール、アミノアセタールを形成する。この接合体は、標的部位において、抗体-酵素接合体の酵素成分である酵素グルクロニダーゼによって切断される。次に、この遊離薬剤は細胞間液にほとんど不溶になり、周囲の細胞の細胞膜に付着し易くなり、その抗体-酵素接合体局在部位において細胞傷害性作用を発揮する。

このようなグルクロニド類を調製する一つの方法は、哺乳類例えばウシ、ヤギ、ウマ、または、霊長類に、該薬剤を注入することである。薬剤のあるものは、動物の肝臓でグルクロニド類に変換され、この薬剤-グルクロニド接合体は尿中に排泄される。この薬剤は、肝動脈または門脈からの、肝臓ポンプによ

る緩慢な静脈内点滴で投与されることが好ましい。次に、尿の収集と、グルクロニド接合体の抽出は、例えばイオン交換クロマトグラフィーによって実施できる。また、別法として、UDP-グルクロン酸を該薬剤と反応させ、次に、グルクロニドを反応混合物から単離するやり方がある。この反応は、哺乳類肝臓の小胞体から単離した酵素の懸液下に実施できる、および/または、この反応は、その小胞体の抽出物もしくはホモジネートの存在下に実施することができる。

そのような基質に変換できる抗癌剤の一種類が、エディルビシンすなわちドキソルビシンの4'-エディマーであるが、これは、アントラサイクリングリコシドであり、ヒトβ-D-グルクロニダーゼ (Aronson, Cancer Res., 45:1995, 1985) の基質であることが判明している。それより毒性基の少ないその他の類縁体~~は~~はさらに溶解性が高くなることが期待され、このような方法にはずっと大きな成績が見込まれる。その他の薬剤、毒素、ホウ素化合物、または、芳香族もしくは脂環式アルコール、チオール、アミノ基を持つキレート剤も、このような接合体形成の候補となる。

基質-薬剤接合体の別の種類は、ポリマー主鎖に附して新機

的に複数の薬剤を結合させたポリマーである。このポリマーは、抗体-酵素接合体の酵素成分に対する基質であってもよいし、または、そのような酵素の基質となるセグメントもしくは分枝を含むものであってもよい。薬剤分子は、該ポリマーに次のように結合される。すなわち、酵素による切断により、ポリマー単位から遊離する該薬剤、または、必要な程度の低い溶解性をもつか、若しくは標的部位の細胞、組織、病巣成分などの場所を取りまく抗体と比較してそのような場所への分配係数がより好適であるほどに十分少ない数の該単位に結合された該薬剤が切り離されるように結合している。

このように使用されるポリマーの例としては、例えば、ポリオール類、多糖類、ポリペプチド類などが挙げられる。多糖類の一例は、デキストラン、すなわちアルファ-グリコシドであって、これは酵素デキストラナーゼで切断される。診断剤または治療剤は、デキストランのヒドロキシル基に感受性を持つ反応基、例えば脱水水物類、イソシアネート類、イソチオシアネート類などを含むように官能化することができる。あるいは、デキストランを、いくつかのやり方で、例えばアミノデキストランに変換することによって誘導化することもできる。

アミノデキストラン (AD) 担体を含む基質-薬剤接合体の製造法は、通常、デキストランポリマー、有利には、約10,000-100,000の平均分子量 (MW)、好ましくは約10,000-40,000、さらに好ましくは約15,000の平均分子量を持つデキストランを開始物質とする。次に、このデキストランを酸化剤と反応させ、その脱水水物類の一部を開環酸化してアルデヒド基を形成する。この酸化は、糖分解性試験、例えば3,5- $\text{I}_2$ を用い常例法によって行なうのが都合がよい。

酸化剤の量は、MWが約40,000のデキストラン1値に対して、約50-150、好ましくは100個のアルデヒド基が生成するように、同時にまた、他のMWデキストランに対してもほぼ同じ割合のアルデヒド基が生成するように、調整するのが好都合である。後にアミン基となるアルデヒド基の数が多くなるのは、該ポリマーがその後ポリリジンのような挙動をとり、同時に酵素切断に対して抵抗性を示すために、不都合である。これより数が少なくなると、薬剤、毒素、キレート剤、または、ホウ素付加因子の負荷量が所望の値を下回ることになり、これは、特に、酵素の代謝回転数が低い場合は不利である。

次に、この酸化デキストランを、ポリアミン、好ましくはジ

アミン、さらに好ましくはモノーもしくはポリーヒドロキシジ  
アミンと反応させる。適当なアミンとしては、例えばエチレン  
ジアミン、プロピレンジアミンもしくは同様のポリメチレンジ  
アミン類、ジエチレントリアミンもしくは類似のポリアミン類、  
1、3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンもしくはその他の  
類似のヒドロキシル化ジアミン類もしくはポリアミン類などが  
挙げられる。アルデヒド基に対して、過剰なアミンを使用し、  
アルデヒド基のほとんど全てを、確実に、 $\beta$ -イミン基（イミン）  
基に変換する。

得られた中間体の還元安定化を、この  $\beta$ -イミン基中間体を  
還元剤、例えば  $\text{NaBH}_4$ 、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$  などと反応させて実施するこ  
とができる。過剰の還元剤を使用して、このイミン基のほとん  
ど全てが、確実に、第二アミンに還元されるようにし、また、  
未反応のアルデヒド基があれば、これをヒドロキシル基に確実  
に還元する。得られた付加物はさらに、通常のふるい分けカラ  
ム中を通過させ、残留結合デキストランを除去して精製するこ  
とができる。AD上に生じた第一アミノ基の数は、秤量したサ  
ンプルをトリニトロベンゼンスルホン酸と反応させ、420  
nmでの光学密度を標準物質を用いて補正することにより推定

できる。この方法により、通常ほぼ完全に、アルデヒド基の計  
算数が、AD上で第一アミン基に変換される。

あるいは、デキストランを通常法により調製し、アミン基  
を導入することもできる。例えば、臭化シアンと反応させ、次  
に、ジアミンと反応させてもよい。

ADは、ある特定の薬剤、毒素、キレート剤、または、ホウ  
素付加因子の誘導体で、その活性形、好ましくはカルボキシル  
基活性化誘導体と反応させなければならない。この活性形は、  
通常的手段、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）  
または水溶性のその変形体を用いて調整される。

メトトレキサート（MTX）が、本発明の接合体を製造する  
場合に用いられる典型的な薬剤であるが、これは、本発明手順  
の一つを例示するのに用いられる。その他の薬剤、毒素、キレ  
ート剤、ホウ素付加因子に対しても、類似の手順が適当な変更  
を加えて用いられるが、このような変更は、当業者には自明の  
ものであろう。MTXの活性化は、DCCのような通常の任意  
のカルボキシル活性化試薬で都合よく実施できる。必要であ  
ればその後で、N-ヒドロキシスクシンイミド（HOSu）と反  
応させ、活性化エステルを形成する。この反応は通常、極性、

非プロトン性溶媒、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、  
ジメチルスルフォキシド（DMSO）などの中で行なう。その  
他の活性化エステル、例えばp-ニトロベンゾエートなども、  
混合酸酐水物と同様、使用することができる。DCC/HOSu  
活性化は穏やかであり、活性化MTXは、水溶液中でADと  
反応させることができるので好ましい。

ADに対する活性化MTXの割合は、AD上に存在するアミ  
ノ基の約半分が反応して、活性化MTXのカルボキシル基とア  
ミド結合を形成する程度のものであることが好ましい。した  
がって、約100個のアミノ基が、開始時MWが約40,000の  
AD上にあるならば、この内の約50までが活性化MTXと反  
応しなければならない。約50:1 MTX:ADの比を用いるならば、  
通常、約25-50個のMTX分子を導入する。これより負荷  
を高くするのは難しく、これは、その不溶性が増すために、付  
加物が沈殿し始めるからである。

その他の薬剤に用いられる応用例として、5-フルオロウラ  
シル（5-FU）による負荷を挙げると、これは、5-フル  
オロウリジン、炭水化物部分を例えば過ヨウ素酸を用いて  
酸化し、この中間体をアミノデキストランと反応させ、さらに、

この  $\beta$ -イミン基付加物を還元的に安定化することによって実  
施できる。シクロヘキサジイミドは、次のようにして負荷するこ  
とができる。すなわち、そのシクロヘキサジンのカルボニルをア  
ミノデキストランのアミン基と直接反応させ、その後、還元  
的に安定化させることによって、あるいは、その類似ヒドロキシル  
を過剰のジイソチオシアネートトリンカーと反応させ、かつ、  
そのイソチオシアネート誘導体をアミノデキストラン上のアミ  
ンと反応させることによって、あるいは、イミド鹽を例えば  
ハロ酸もしくはハロエステルと反応させ、その後、得られたカル  
ボキシル誘導体を例えばDCCと反応させ、かつ、アミノデ  
キストラン上のアミンと結合することによって、負荷すること  
ができる。

もう一つの例は、抗生物質マイトマイシンCと、その環状体  
から得られる。この分子は、アミン基と環状イミンを持つが、  
そのいずれかを、アルキル化活性化基例えばスクシンイミル  
オキシヨード酢酸、または、スルホスクシンイミルオキシ  
（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ- $\beta$ -IAA）  
と反応させることができる。次に、得られた中間体を用いて、  
アミノデキストラン上のアミノ基をアルキル化する。別法とし

て、カルボキシル基を例えば無水コハク酸を用いて導入し、次に、例えばDCCを用いて活性化し、この活性化中間体は前記と同様に結合させる。

通常、例えばアメリカマゴボウ抗ウィルス蛋白質(PAP)もしくは、リシンA酸などは、グルタルアルデヒド重合によって、または、該蛋白質上の活性化カルボキシル基をアミノデキストラン上のアミンと反応させて、結合することができる。

上に挙げた特定例以外にも、腫瘍細胞や、ヒトに感染して病気の原因となる微生物に対して細胞傷害性作用を持つ薬物および毒素はたくさん知られている。そのようなものは、薬物や毒素の解説書、例えばメルク・インディックスなどに見ることができる。このような薬物はいずれも、この分野には周知の、また、前記のものとの類似から推想される通常法によって、AD上に結合することができる。本発明に従えば、ある薬物を複合体として、その循環中に部分的にまたは完全に無毒化できるということは、その薬物の全身性副作用を軽減し、非接合型の薬物の全身投与が受け入れられない場合でもその使用を認めることができる。例えば、MTXとシクロヘキシイミドは、全身的に投与した場合、毒性が強すぎるが多い。本発明に従うな

に、多量薬-薬物複合体の小部分が結合酵素から逃れて拡散してしまうからである。すなわち、その薬物が周囲の流体から割合よく分配されて、標的部位、例えば腫瘍細胞膜、細菌細胞壁、動脈硬化プラーク、または、フィブリン凝血などに蓄積するほど十分に、その溶解性が低下しないからである。毒素は、大蛋白質であることが多いために、薬物よりも負荷量を減らし得る。

放射性金属用のキレート剤または磁気共鳴増強剤も、この分野では、よく知られている。典型的なものは、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)およびジエチレントリアミンペンタ酢酸(DPTA)の誘導体である。これらは、通常、側鎖に官能基を持ち、これによって、このキレート剤は担体に結合される。この同じ基を用いて、キレート剤をAD上のアミン基に結合する。あるいは、キレート剤上のカルボキシル基またはアミン基を結合させ、AD活性化をもたらすか、または、あらかじめ誘導化を行い、次に結合を行なう。これらはいずれも既知の方法で行なうことができる。例えば、6-17のキレート剤であるデフエロキサミンは遊離アミン基を持つ。このアミン基は、適当なリンカーで活性化されて活性化カルボキシル、イソチオシアネートなどの基を含むこととなり、さらに、AD上のアミ

らば、基質担体に結合されたこの薬物のさらに多数分子を脱分子しても、それは、全身性の毒性を緩和するばかりか、治療を可能にする。

基質担体上への薬物の負荷は溶解性(標的部位を浸す流体と、標的細胞、組織またはその他の構造、例えば動脈硬化プラーク、フィブリン凝血、ウィルス粒子、寄生物などとの間の分配係数)に、また、基質分子もしくはサブユニットを酵素切断して、所望の治療作用を発揮するのに十分好適な標的への分配係数をもつ薬物を含ませる効率に、依存するであろう。一般に、薬物をデキストラン上に負荷するのは、単量サブユニット対薬物の比が約3〜約5となるようにするのが望ましい。もっともこれはそうするのが望ましいのであって、限定的な量ではない。薬物分子の負荷が過大になると、酵素活性を阻害することがある。これは、主に、基質複合体が酵素の活性化部位に結合するのを妨げる立体障害によって起こる。負荷が過小であると、酵素切断の結果として得られる薬物の流体溶解性低下が、十分に行なわれないことがある。これは、薬物(恐らく、まだ、2〜3のグリコッドサブユニットがそれに結合している)の溶解性を低下させるのに十分なほどの複サブユニットが切断遊離される前

に結合する。キレート剤をADのアミンに結合させるその他の方法は、キレート剤の官能性に依るが、当業者には自明であろう。

ホウ素付加因子(hydrobating agent)、例えばカルボランは、基質複合体に結合され、抗体によって病巣にターゲティングされた場合、熱中性子照射によって活性化され、放射性原子に変換される。この原子はアルファ放射によって崩壊し、きわめて細胞障害性の強い局所作用をもたらす。ホウ素付加因子を高度に負荷することは、磁気共鳴増強イオンと同様、その作用を強化するのにきわめて重要である。カルボランは、本分野においてはよく知られているように、ペンダント側鎖上のカルボキシル基を用いて作られる。このカルボランを、カルボキシル基の活性化および担体上のアミンとの結合によってAD上に結合させることにより、有用な基質-薬物複合体の調製が可能である。

本発明の一実施態様においては、基質-薬物複合体は多数のホウ素原子を含むが、さらに好ましくはホウ素-10同位元素に富む試薬から調製するのがよく、約96%ホウ素-10に富むホウ素含有試薬が市販されている。このような複合体は、中性子活性化放射線療法においてはきわめて有用である。なぜ

なら、これによって腫瘍部位または病巣部位に十分な数のホウ素原子をもたらす、熱中性子照射の際に核的組織にアルファ粒子の治療量を提供することが可能になるからである。しかも、これは、核的組織に局在する抗体-酵素複合体の投与量のパーセントが比較的低い場合例えば1-10%でも実現可能である。このような局在パーセントは、抗体-核的化種 (antibody-nuclearized species) にとってはそれほど珍しいことではない。

本発明のホウ素負荷基質複合体は、基質分子あたり多数のボロン原子を持つ。これは、通常、少なくとも約50から約10,000個、好ましくは約100から約1,000個である。換り返すと、これらは、天然存在量20%のホウ素-10同位元素を含むもっと多数のホウ素原子を持つ複合体を使用する方がコスト的には有利であるが、好ましくは約95%のホウ素-10に富むものであることが望ましい。

基質-薬剤複合体は、ホウ素を含まない部分、または、ホウ素とその他の有用な基とを含む部分を備えるものであってもよい。このような基は例えば、核種、特に $^{113}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、もしくは $^{131}\text{I}$ 、または、機能基団例えばキレート剤、金属イオンを

含むキレート、薬剤、色素、発色団、発色原、蛍光マーカーなどであり、これらはいずれも、その治療効果を増したり、ホウ素付加因子の付着および/またはクリアランスの監視を可能にしたり、補助的な治療作用を行なうものである。基質-薬剤複合体には機能基団を取り込んでもよく、その主要目的は溶解性を増したり、ホウ素付加因子を含む酵素切断産物の水溶性を減らしたりすることにある。

このような複合体を作るにあたって、ホウ素のかご型化合物を用いると便利であるが、これは、比較的取扱いやすいこと、また、そのようなかご型化合物の各々が、5-12個のボロン原子を核的部に運ぶことができることによる。当業者ならば、以下に論じる反応の多くについて、この分野における一般的な参考文献を知ることができるであろう。中でも、もっとも良く、もっとも包括的なのは、Muetterichら、'Polyhedral Boranes', (Decker, New York, 1968); Muetterich 編、'Boron Hydride Chemistry', (Academic Press, New York, 1975); Grimes, 'Carboranes', (Academic Press, New York, 1970) である。上記文献には、複数のホウ素原子を含む有機無機体の合成という広範な主題範囲内で特定テーマについて豊富

な文献が含まれている。Hawthorne, アメリカ国特許出願第141,434号、(6-7-15 出願) にも詳細が載っており、この出願を参照として、そのまま本明細書中に含めることにする。

デキストランやアミノデキストランのようなアルファ-グリコシドに代わるものとして、カルボキシメチルセルコース (CMC) のようなベータ-グリコシドがある。これはセルラーゼ酵素によって切断される。このCMCに診断剤または治療剤を結合させる方法はデキストランの場合と同じであるが、その理由は、両方とも糖ポリマーであり、グリコシド結合の立体化学が異なるだけだからである。CMCから付加的機能分子を調導することは、CMCをカルボジイミド型の結合剤と反応させ、診断剤または治療剤上のアミン基を用いてアミド結合を形成させることによってもっとも好都合に達成されるであろう。あるいは、グリコール切断試薬例えば過ヨウ素酸塩で穏やかに酸化し、ポリマー鎖上の複数の部位にアルデヒド基を形成させ、次いでジアミンと反応させれば、様々な官能基と反応させるのに都合のよいアミノCMCを形成することができる。この酸化CMCをアミンと縮合し、水素化ホウ素による安定化を図ることも実施可能である。薬剤をCMCに結合させるその他の手段

については、当業者には自明であろう。

ポリマー基質におけるさらにもう一つの変形体は、酵素で切断されないが、酵素の基質となるオリゴマーの短いリンカーセグメントを有し、かつ、薬剤、キレート剤、ホウ素付加因子、類似の診断剤もしくは治療剤を有する、ポリマーである。一つの例として、ポリビニールアルコールを、複数の短いオリゴサッカライド例えば短いデキストランやセルコースオリゴマー（これらは、例えば5-50個、好ましくは5-20個のグリコシドサブユニットからなる。）用の担体として用いることもできる。ポリビニールアルコールを、例えば臭化シアンでアミノ化し、次いでジアミン縮合してもよい。オリゴサッカライドは、例えば過ヨウ素酸塩で穏やかに酸化し、アミン化ポリマーで縮合して1:1の塩基結合を形成し、これを好ましくはさらに、水素化ホウ素還元によって安定化させる。次に、得られたオリゴマー結合ポリマーを、デキストランポリマーやセルコースポリマーについて前述したように穏くアミン化してもよいし、または、そうでなければ通常の方法で官能化し、各オリゴマーリンカー上に少なくとも2個、好ましくは約2-5個のアミン基を結合させる。次に、平均約1-3個の薬剤分子、キレート

剤、ホウ素付加因子、その他の薬剤をこのオリゴマーの各々に結合させる。

他にもたくさんの変形体が考えられることは自明であろう。強く酸化されたデキストランオリゴマーリンカーをアミン化ポリマーおよび薬剤もしくはその他の薬剤に結合することは同時に行なってもよいし、連続的に行なってもよいが、その後に安定化する。薬剤上の他の官能基を用いて、オリゴマーに結合してもよいし、また、その他の官能基を用いてオリゴマーをポリマー担体に結合させてもよい。

アクリル酸ポリマーを用いてもよいが、この場合、アクリル酸カルボキシルをカルボジイミドで活性化することによって形成されたアミド結合により、アミノデキストランオリゴマーをそのポリマーに結合させる。ポリペプチドを用いてもよく、この場合、担体上のカルボキシルまたはアミン残基にオリゴマーリンカーを結合させる。オリゴサッカライドリンカーの代わりに、短いポリエステルもしくはポリゴペプチドリンカーを用いてもよく、この場合、そのリンカーを切断するエステラーゼもしくはペプチダーゼ酵素を含有させる。当業者ならば、本発明の広範な範囲内に含まれ、かつ、通常の合成法によって調製でき

る他の変形体を見ることができるであろう。

さらに別のアプローチは、次のような担体ポリマーを用いることである。すなわち、薬剤、キレート剤、ホウ素付加因子またはその他の薬剤を保持し、かつ、未修飾の形で、標的に対し強い指向性を持つが、その後結合による修飾<sup>(3)</sup>を受けて、基質分子を可溶化し、その分子はターゲティング酵素によって切断される、ポリマーである。このような基質-薬剤複合体に属する別種の一例はポリリジンであり、そこに、複数の放射性金属もしくは常磁性金属キレート剤、カルボランまたはMTX分子を結合させたものである。次に、この担体複合体を、複数の短いデキストランオリゴマーと、例えば 1:111 塩基形成によって結合し、強く酸化されたデキストランを形成し、水素化や酸素安定化を行う（もしキレート剤が担体に結合されているならば、その後、放射性同位元素もしくは常磁性イオンを負荷する）。これを、ポリリジンの溶解性を増し（「粘着性」を減らし）、それを血漿中で運搬しやすいように、また、毛細血管を通過しやすいようにする比率で行なう。標的部位、例えばある腫瘍において、局在する抗腫瘍抗体-デキストラナーゼ複合体は、このポリリジンからデキストラン被覆を、それが再び「ねばねば

になる」ほど十分に剥ぎ取り、それによって、このものは腫瘍細胞に接合し、この結合ポリリジンは、診断剤または治療剤を結合しているので、この腫瘍細胞に作用し、その腫瘍化または細胞障害性治療を可能にする。

高度にアミノ化したアミノデキストランをポリリジンとして作用させたり、上に論じたような短いオリゴマー-基質リンカーで置換してもよい。このものは、ポリリジン同様、細胞膜やその他の組織に対して「ねばつく」。その他のポリペプチド、または、高度にアミノ化したポリマーも、同様に担体として、基質のコーティングおよび可溶化に機能することができる。實際に、アミノ化は、負荷した担体の機能にとって必須ではない。なぜなら、ある担体と1種以上の診断剤および/または治療剤との複合体から好都合な分配をもたらす官能性は、それが何であれ、基質オリゴマーを可溶化することによって、または、小さな基質分子を可溶化するだけで、マスクすることができるからである。すなわち、得られた可溶性の複合体は、血清または別の投与媒体中で容易に循環するが、標的部位を渡す媒体中では、被覆分子が抗体-酵素複合体に局所する酵素の作用によって切断されることにより、離散性となる、そのように可溶化が

行なわれる。

負荷された担体ポリマーの、「被覆性」可溶性基質またはオリゴマーに対する割合は、標的部位の性質や成分の特性によって異なる。もしポリリジンもしくはそれに相当する糖鎖をもつ等価物を担体として用いる場合、オリゴデキストランによる被覆は、重量で約1:10から約100:1のデキストラン:ポリリジンの割合で、好ましくは約1:1から約10:1の割合で、さらに好ましくは約3:1から約7:1の割合で行なうのが有利である。一つの例は、MW約1,500ダルトンのポリリジンで、これを、それぞれMW約15,000ダルトンの約3-7倍のデキストランオリゴマーで被覆したものである。

例えば、Goldsbire, アメリカ特許第4,124,141号に開示されている通り、複合体と複合体形成してマクロファージや腸内皮系による被覆体の取り込み速度が増進するように第二の抗体を使用することによって、診断剤または治療剤が局在もしくは付着するのに十分な時間の経過した後に、抗体-酵素複合体および/または基質-酵素複合体のクリアランスを加速することができるなら好都合であろう。このような第二の抗体クリアランスのための最速時間は、そのいずれかの複合体上の糖鎖

の助けを借りて測定でき、これによって、標的部位における抗体-酵素接合体の局在の程度、および／または、標的部位における薬剤付着の程度、および、非ターゲティング接合体の生体内分布が監視できる。

試薬は、ヒトの治療および診断用に、2重の注射製剤 (injectable preparation) として供給されると好都合である。第1の注射製剤は酵素に結合された抗体もしくは抗体フラグメントの有効量を、既量的に受容可能な注射用ベヒクルに、好ましくは、生理的 pH と濃度を持つ緩衝液 (PBS) に溶解させたものである。第2の注射製剤は、少なくとも1種の診断剤もしくは治療剤に結合された可溶性基質の有効量を、既量的に受容可能な注射用ベヒクル (一般的には、第1の製剤に使用されるものと同じもの) に溶解させたものである。この注射製剤は、特にヒトへの使用を意図したものである場合、滅菌性のものであるのが好ましい。

試薬はまた、2個の適当な容器を用い、標的部位への抗体ターゲティングのための治療用もしくは診断用キットとして供給されると好都合である。第1の容器は、酵素に共有的に結合した抗体または抗体フラグメントの有効量を含む。第2の容器は、

少なくとも1種の治療剤もしくは診断剤に結合した可溶性基質の有効量を含む。試薬は、保存安定性を延ばすために凍結乾燥してもよいし、または、溶液の形で、必要に応じて過剰の保存剤、安定化剤などを含ませて供給してもよい。このようなキットに入れるその他の任意成分としては、通常、バッファー、緩衝試薬、放射性同位元素、常磁性化合物、クリアランス助長のための第2の抗体、通常の注射剤、カラム、瓶などがある。

本発明の方法は、通常、非経口的注入によって実施される。種々の非経口注入、例えば、体内腔 (例えば、腹腔内)、静注、動注、胸膜内、硬膜内、筋注、リンパ管内、局所動注、局所静注、皮下、カテーテル灌流などであるが、これらに限定されない。

癌の画像化および／または治療としては、静注、動注、胸膜内投与が、通常、肺、胸、白血球癌に使用される。腹腔内投与は、卵巣腫瘍に好都合である。硬膜内投与は、脳腫瘍や白血病に有利である。皮下投与は、ホジキン病、リンパ腫、肺癌に有利である。カテーテル灌流は、肺や胸部の転移癌、肝臓の芽生癌癌に有効である。動注内投与は、肺や胸部の病変に有効である。

上記は、本発明の抗体-酵素接合体および基質-治療剤もしくは診断剤接合体を投与する場合の一般的方法を例示したものである。2種の異なる接合体の投与法は、両接合体のクリアランス経路と生体内分布は一般に異なるために、同じでなくてもよいことは了解されるであろう。例えば、抗体-酵素接合体の腹腔内投与は、卵巣腫瘍を標的にするには有利であるが、画像化のためには、放射性同位元素-基質接合体を静注投与するのが望ましい。なぜなら、後者の場合、付着速度をコントロールしやすいし、また、クリアランス速度を監視しやすいからである。

抗体-酵素接合体は一般に、PBSに、好ましくは、特にヒトに使用する場合には、滅菌液に溶解した水溶液として投与される。抗体-酵素接合体約  $5 \mu\text{g}$  ～ 約  $50 \mu\text{g}$  の投与量を、単回投与もしくは分割投与で投与するのが好都合である。もっとも、これより少ない投与量または多い投与量でも、特定の症例に対しては適正であり得る。次のような場合には、用量を減らしたり、および／または、他の動物種からの抗体および／または低アレルギー性抗体を用いることが必要になることがある。すなわち、特に治療のために患者の感受性を下げたり、特に、

治療法として、または、さらにそれに加えて診断法のために、繰り返し投与が必要な場合である。このような注意的処置が必要な場合の指針としては、ヒト抗マウス抗体 (HAMA) 産生の増加がある。これは、イムノアッセイを用いて定量できる。

IgG抗体が標的部位に局在し、その哺乳類の循環系から実質的に除去され、基質-薬剤接合体投与の効果が衰うまでには、通常、約2から14日、好ましくは5から14日かかる。 $I(1)$  および  $I(1')$  抗体フラグメントの対応の局在化およびクリアランス時間は、約2から7日、好ましくは4から7日であり、また、 $I(1)$  および  $I(1')$  抗体フラグメントにおいては、約1から3日、好ましくは3日である。その他の抗体は、標的部位に局在するのに別の時間枠を必要とするかもしれない。また、上記の時間枠も、接合された酵素の存在の影響を受けることがあるかもしれない。ここでも付記するが、抗体-酵素接合体を破壊すれば、それによって、局在化およびクリアランスを監視することができる。

IgGは、普通、肝臓で代謝され、僅かに消化系で代謝される。 $I(1)$  および  $I(1')$  は、普通、主に腎臓で代謝されるが、肝臓でも、消化系でも代謝される。 $I(1)$  および  $I(1')$  は、普

速、主に腎臓で代謝されるが、肝臓でも、消化系でも代謝される。

通常、基質-酵素複合体の投与前には、抗体-酵素複合体投与量の、少なくとも約0.001%が標的部に局在していなければならない。この複合体のターゲティング効率が高ければ高いほど、このパーセントが高くなり、低い投与量を与えればよいことになる。

このことから、抗体-酵素複合体有効量とは、その複合体を標的部の抗原にターゲティングするのに十分な量であって、それによって十分な量の酵素を結合させ、それによって十分な量の可溶性基質-酵素複合体を産物に交換し、その結果、薬剤の診断もしくは治療に有効な量の産物を標的部にもたらすような量である。

基質-治療剤または診断剤複合体は、一般に、PBS中の水溶液として投与される。この場合も、ヒトへの使用を意図する場合は、滅菌液とする。基質-薬剤複合体は、抗体-酵素複合体が標的部に局在し、哺乳類の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過して後、投与される。

局中性子活性化治療用に、ホウ素付加因子負荷担体の複合体

を用いる場合も、通常、同様にして行なう。すなわち、非ターゲティング基質-薬剤複合体が除去されるのを待って、始めて中性子照射を実施するのが好適である。このようなクリアランスは、例えば、アメリカ国特許第1,111,111号からも分かるように、第2の抗体を用いることによって加速することができる。

基質-薬剤複合体の有効量とは、その薬剤の有効量を標的部に送達するのに十分な量であり、また、基質が酵素によってある形の産物に交換され、その産物を標的部に蓄積させるような基質量である。治療剤または診断剤の有効量とは、標的部の治療、診断に十分な量である。

もしシンチグラフィ画像を実施する場合には、基質-薬剤複合体は、基質に結合した放射線核種を含むだろう。これは、放射性金属のキレートでも、直接ヨウ素化もしくは金属化した化合物であってもよい。適当なガンマ放射同位元素としては、 $^{1-11}$ 、 $^{1-111}$ 、 $^{7-111}$ 、 $^{18-111}$ 、 $^{61-67}$ が挙げられる。抗体は標的部の抗原に結合するものであり、酵素は基質-薬剤複合体をある産物に交換するものであるが、その産物は、画像化を可能にするほど十分な量の標的部に蓄積するものである。一旦、十分な同位元素が標的部に付着したならば、走査を、通常の平

面型ガンマカメラおよび/またはSPECTガンマカメラのいずれかによって行うか、あるいは、外部的もしくは内部的に使用される手動操作型ガンマプローブによって実施し、腫瘍、感染の生物学的微小位置、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、または、その他の標的部の位置を特定する。通常、シンチグラムは、1個以上のウィンドウを持つガンマ画像カメラによって撮影する。これは、50-500 keV範囲のエネルギーの検出に用いられる。高エネルギーベータもしくはポジトロン放射を伴う放射性同位元素を用いる場合、適当な検出器を備えた画像カメラを使用しなければならない。これらはすべて、この分野においては過剰のことである。

一例として、ポリリグニンオリゴマーを、スクシニミジルプロイソチオシアネートペンゾエートリンカー（アメリカ国特許第4,111,111号）を用いて、複数のアミノメチル-DTPAキレート剤に結合させ、次に得られた化合物を、種やかに酸化させ、複数のデキストラオリゴマーと反応させ、次にそれを、水素化ホウ素で安定化させる。患者、例えば癌患者に、抗腫瘍抗体とデキストラナゼ酵素との複合体を注入し、その複合体の局在と、非ターゲティング複合体のクリアランスのために7日を

かける。次に、この基質-キレート剤複合体を、PBS中のろ過滅菌インジウム-111イオンを用いて荷電し、患者に注入する。標的の蓄積は、約3時間以内に観察され、バックグラウンドレベルのクリアランスは、約12-24時間でほぼ完了したので、この時点で画像化を実施する。

磁気共鳴画像(MRI)も、シンチグラフィ画像と同様の方法で実施するが、画像化剤は、放射性同位元素ではなく、MRI増強物質を含む。磁気共鳴現象は、シンチグラフィとは別の原理で動作すると理解される。通常、発生した信号は、画像化される領域における水分子の水素原子核内磁子の磁気モーメントの緩和時間と相関する。磁気共鳴画像増強剤は、緩和速度を増し、それによって、画像化剤が蓄積する領域の水分子と、体内のそれ以外の部分の水分子との間のコントラストを増す。しかしながら、この画像化剤の作用は、 $T_1$ と $T_2$ の両方を増すべきであり、前者はコントラストの増加を招き、後者はコントラストの減少を招く。したがって、この現象は、濃度依存性であって、通常、ある常磁性物質については、最大効率に対する至適濃度が存在する。この至適濃度は、用いる特定の薬物、画像部位、画像方式、すなわち、スピンエコー、飽和-



回復、逆転一回復の各方式や、その他の種々の強力に $T_1$ 依存性もしくは $T_2$ 依存性の画像技術、異物を溶解もしくは蒸発する溶媒の組成、によって異なる。これらの因子およびその相対的重要性は、本分野においては既知のものである。例えば、Pykell, Scientific American, 245:78 (1982), Roughton, *Am. J. Radiol.*, 141:1209 (1983)を参照せよ。

MRI画像増強に有効な化合物の例としては、常磁性 $Gd(III)$ ,  $Eu(III)$ ,  $Dy(III)$ ,  $Pr(III)$ ,  $Po(IV)$ ,  $Mn(II)$ ,  $Cr(III)$ ,  $Co(III)$ ,  $Fe(III)$ ,  $Cu(II)$ ,  $Ni(II)$ ,  $Ti(III)$ および $V(IV)$ イオンもしくは基(例えば、ニトロキシド類)が挙げられる。これらは、イオン用の常磁性イオンキレート剤、または、高付加因子(radical addends)用のリンカーを担持する基質に結合される。磁気共鳴画像増強剤は、通常用いられ、患者の安全性、装置の設計に抵触しない磁場強度において、外部カプラによって検出できるほど十分な量として存在しなければならない。このような異物に対する条件は、本分野においては、海綿中の水分子に対して作用するものについてよく知られており、特に、Pykell(上掲)およびRoughton(上掲)に開示されている。

してもよい。こうすれば、十分なホウ素付加因子が標的部に局在したこと、および、非ターゲティングホウ素-10のほとんど全てが循環系を離脱したことを、中性子照射の前に、確かめることができる。

基質-薬剤複合体の用量単位は、多くの因子に左右されるが、その因子のそれぞれを、用量測定値(dosimetric)が最適値を示すように、比較的単純なやり方で定量することができる。最初の用量測定に当たっては、放射標識基質-薬剤複合体(もし薬剤そのものが放射性同位元素でない場合)を用いて、標的部における薬剤の付着量、付着速度、クリアランス速度、非ターゲティング複合体の生体内分布を定量するのが便利である。標的部に局在する酵素の量を推定するのに、標識抗体-酵素複合体を用いるのも、用量測定値分析にとって有効である。

一般にはまず動物モデルを用いて用量測定試験を実施し、ついで可能ならば、一連の臨床試験を実施する必要がある。これは、基質-薬剤複合体の至適用量を、部位の至近性(accessibility)、投与法、酵素の代謝回転数、部位に対する薬剤の所要用量、非ターゲティング(non-targeted)複合体のクリアランス速度の関数として、知るためである。この関係は予

磁気共鳴画像(MRI)においても、シンチグラフィに用いたものと同じ方法が用いられる。前の例では、高コントラストのMRI増強を實現するためには、多数の常磁性イオンを標的部に搬送するのが望ましいので、ポリリジンに多量のキレート剤を負荷し、比較的大量の抗体-酵素複合体と基質-キレート複合体を投与し、これによって、高濃度の常磁性イオンを標的部に付着させる。

本発明の治療法は、放射性同位元素、例えば $^{90}Sr$ もしくは $^{131}I$ (これは局所化と治療の両方に用いることができるが、投与量に依存する)の治療有効量を、または、癌用にアドリマイシン、感染症用にゲンタマイシンなどの薬剤を、または、ポリ-ICのような免疫調節物質を、または、アメリカヤモゴボウ由来ミトゲンのような生物毒素を、基質に結合し、その薬剤の有効量を標的部に付着することによって達成することができる。本発明の治療法はまた、1個以上のホウ素-10付加因子を基質に結合し、一旦このホウ素-10が標的部、例えば腫瘍に付着したならば、外部から熱中性子照射をこの腫瘍に施し、その癌細胞を破壊することによっても實現することができる。ホウ素-10複合体には、放射性同位元素キレートで標識

剤がつくし、また、至適化のための方法も、臨床家の日常技術の範囲内にある。

これ以上細部にわたって説明しなくとも、当業者であれば、前述の説明を用いて、本発明を十分に利用することは可能であると考えられる。したがって、下記の個々の好ましい具体例は単に例示として显示されるものであって、いかなる意味でも本開示のその他の部分に対して限定的に作用するものではない。下記の実施例では、温度はすべて、補正無しの実氏度で表したものであり、また、特に断わらない限り、部およびパーセントはすべて重量に基づくものである。

#### 実施例1

##### メトトレキサート/アミノデキストラン複合体の調製

##### (a)メトトレキサートの活性化

乾燥した反応瓶に、1 mlの無水DMFに溶解した45.4gのメトトレキサート(0.1 mol, Sigma)を、注射器で入れた。1510  $\mu$ lの無水DMFに溶解したN-ヒドロキシスクシンイミド(23g, 0.1 mol, Sigma)と、750  $\mu$ lの無水DMFに溶解した1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(41.5g, 0.1 mol, Sigma)をさらに添加した。反応混合物を、暗所下、重

温で、18時間、無水条件下に攪拌した。白色沈澱を遠心し、透明溶液を密栓瓶に入れ、-20℃で保存した。

#### (b) アミノデキストランとの反応

アミノデキストラン (10g,  $1.5 \times 10^4$  mol) を、2 ml の PBS, pH 7.2 に溶解した。活性化MTX ( $125 \times 10^4$  mol) を徐々に加えた。溶液を、室温で、5時間攪拌し、セファデックスG-25カラムで精製した。ボイドボリュームを集め、さらに、反応バッファーに対して透析した。凍結乾燥後、2.1 mg の生成物を得た (収率21%)。メトトレキサートの取り込み量は、370 nm での吸収により、38メトトレキサート/デキストランであると決定された。

#### 実施例2

##### キレート剤-ポリリジン/デキストラン複合体の調製

ポリリジン (MW 15,000) を、このポリリジンに平均5個のDTPAを結合させるに十分な量の、アミノメチル-DTPAのスクシンイミジルp-イソチオシアネートベンゾエート誘導体 (スクシンイミジルベンゾエートが、チオウレア結合により、DTPAに結合したもの) と反応させる。得られた生成物を、1個のデキストラン当り約2個のアルデヒド基を生ずるの

り、水酸化ホウ素により安定化する。この複合体は、通常法により、I-131によって放射標識することができる。

(B) 上記Aと同様にして、抗白血球IgGをグルクロニダーゼ (牛肝臓由来, Worthington) に結合する。

#### 実施例5

##### 肺癌の治療

右肺の小細胞癌を持つヒト患者に、PBSに溶解した抗CEA IgG/デキストラナーゼ複合体 (5g) を含む、滅菌性、発熱性物質非含有溶液を静注した。この溶液は、この実施例4 (A) にしたがって調製され、I-131で標識されている。5日後、複合体は肺に十分局在し、患者の循環系からはほとんど除去された。これは、毎日、シンチグラフィー走査を行って確認した。

MTX/アミノデキストランの、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液 (実施例1に準じて調製し、当該複合体 (5g) を含む) を、次の4日間毎日静注した。その後I-123-抗CEA Fabを用いる放射免疫検出により、腫瘍が有意に減少していることが分かった。

に十分な程度に通ウ素酸塩であらかじめ強く酸化したデキストランオリゴマー (MW 1,500) と反応させる。この反応を、ポリリジン-DTPA上に約3-5個のデキストラン単位を負荷するのに十分な量で行なう。さらに、水酸化ホウ素で安定化し、Schiff塩基結合と残存アルデヒド基を還元する。

#### 実施例3

##### エビルビシン-グルクロニド複合体の調製

エビルビシンを、数週間置いて、ウマに静注する。尿を集め、尿をイオン交換クロマトグラフィーにかけてエビルビシン・グルクロニドを単離し、さらに、カラムクロマトグラフィーおよび/またはHPLCによって精製する。

#### 実施例4

##### 抗体-酵素複合体の調製

(A) 実質的に単一結合 (monoclonal) した酵素-抗体調製物は、次のようにして調製される。すなわち、抗CEA IgGの脱水化物部分を通ウ素酸塩で穏やかに酸化し、次に、この酸化IgGをデキストラナーゼ (Pierce & Warriner Biochemical Corp., Freehold, NJ) の希釈液に接触させて抗体-酵素複合体を生成し、次に、これを、通常法

#### 実施例6

##### リンパ腫の治療

リンパ腫を患うヒト患者に、抗リンパ腫IgG-グルクロニダーゼ複合体 (5g) を含む滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この複合体は、実施例4 (b) にしたがって調製され、I-131で標識されている。ガンマ走査によって決定されるように、8日後、この複合体は、標的部位に十分局在し、循環系からはほとんど除去されていた。

次に、患者に、10 mg のエビルビシン・グルクロニドを含む、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この溶液は、実施例3にしたがって調製されたものであり、また静注は、次の4日間毎日行なった。その後、放射免疫検出により、リンパ腫は有意に減少していることが分かった。

#### 実施例7

##### 腫瘍放射免疫検出

直腸癌のヒト患者に、抗CEA-IgG/デキストラナーゼ複合体5 mg を含む、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この複合体は、実施例4 (A) に従って調製された。7日後、患者に、Ia-III 標識ポリリジン-DTPA/デキスト

ラン接合体 5mgを含む、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この接合体は実施例2に従って調製され、<sup>111</sup>In-IIIが含有されている。24時間後、シンチグラフィ画像において、腫瘍部位に、十分量の放射同位元素の蓄積が見られた。

#### 実施例8

##### 癌のMRI画像化

上行結腸癌のヒト患者に、抗CEA-1gG/デキストラーゼ接合体 5mgを含む、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この接合体は、実施例4(A)に従って調製された。7日後、患者に、<sup>64</sup>Ga(III) 含有ポリリジン-DTPA/デキスラン接合体 50mgを含む、滅菌、発熱性物質非含有PBS溶液を静注した。この接合体は、実施例2に従って調製された。さらに2日後、MRI画像を撮影したところ、腫瘍像が示され、それは周囲の組織と十分に区別された。

前記の実施例において用いられた、一般的、特定の記載された本発明の反応剤および/または操作条件を置換して繰り返しても、同様の成績を収めることができた。

前記の記載事項から、当業者であれば、本発明の本質的な特

徴を確認することは容易であり、その思想や範囲から逸脱することなしに、本発明に様々な変更や修正を加えて各種の用法、条件に合うように変えることは可能である。

補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第114条の1)

平成4年8月11日

特許庁長官 沢 沢 巨 取

1. 特許出願の表示 PCT/US 89/05441

2. 発明の名称 診断薬または治療薬の抗体ターゲティング

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07860、ウオーレン、  
シー・エヌ・4818、マウント・ベテル・ロード・150  
名 称 イムノメディックス・インコーポレイテッド

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル

(郵便番号160) 電話(03) 3354-8823

(1240) 弁理士 川 口 敏 雄

(ほか4名)

5. 補正書の提出年月日 1991年10月3日

6. 添附書類の目録

(1) 補正書の翻訳文



1通

#### 請求の範囲

1. 診断剤または治療剤を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 標的部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素接合体を哺乳動物に経口的に注入する段階、但し、前記抗体は標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記抗体-酵素接合体が標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記部位に付着するのに十分な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1個の診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記産物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、

前記基質-薬剤複合体の投与経路または生体内分布経路に沿う特異的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在しない、

前記段階を包含することを特徴とする方法。

2. 前記抗体-酵素複合体中の抗体が、腫瘍、感染もしくは寄生虫病、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性細胞の損傷関連部位、または、傷害を受けた正常細胞の損傷関連部位によって産生されるかまたはそれらに関連する抗原に特異的に結合する、請求項1に記載の方法。

3. 前記抗体-酵素複合体中の前記酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エステラーゼである、請求項1に記載の方法。

4. 前記酵素が、デキストラナーゼ、セルラーゼ、または、グルクロニダーゼである、請求項3に記載の方法。

5. 前記薬剤が診断剤である、請求項1に記載の方法。

6. 前記薬剤が、10-500 eVエネルギー範囲で放射するガンマ放射線の放射性同位元素である、請求項5に記載の方法。

7. 前記薬剤が、磁気共鳴画像増強用の常磁性イオンである、請求項5に記載の方法。

1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この担体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デキストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項13に記載の方法。

16. 前記基質-薬剤複合体が非基質性ポリマーを含み、このポリマーに、少なくとも1つの基質オリゴマーが結合され、このオリゴマーに、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されている、請求項13に記載の方法。

17. 循環系からの抗体-酵素複合体のクリアランスまたは標的部位におけるその複合体の局在をモニターするために、前記抗体-酵素複合体がさらに、放射性同位元素もしくは磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。

18. 循環系からの基質-薬剤複合体のクリアランスまたは標的部位におけるその複合体の局在をモニターするために、前記基質-薬剤複合体がさらに、放射性同位元素、磁気共鳴画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項1に記載の方法。

19. 前記哺乳動物がヒトである、請求項1に記載の方法。

8. 前記薬剤が治療剤である、請求項1に記載の方法。

9. 前記薬剤が、ベーターもしくはアルファ放射線の放射性同位元素、毒物、毒素、ホウ素付加因子、血管拡張剤、サイトカイン、光増感剤、または、放射線増感剤である、請求項8に記載の方法。

10. 前記非経口注入が、体腔内、静脈内、動脈内、腹腔内、硬膜内、リンパ管内、筋肉内、関節内、皮下、または、カテーテル灌流経路によって実施される、請求項1に記載の方法。

11. 前記基質が低分子量化合物である、請求項1に記載の方法。

12. 前記基質が前記薬剤のグルクロニド複合体である、請求項11に記載の方法。

13. 前記基質がポリマーである、請求項1に記載の方法。

14. 前記基質が、デキストラン、アミノデキストラン、カルボキシメチルセルロース、または、ポリペプチドである、請求項13に記載の方法。

15. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤複合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン担体を含み、この担体に、少なくとも

20. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための二重灌流注射剤であって、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクル中に、標的部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素複合体を含有する、第1の滅菌注射液、但し、前記抗体は標的部位の少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤複合体を含有する第2の滅菌注射液、但し、前記複合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤複合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および前記基質-酵素複合体に關して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤複合体の投与経路または生体内分布経路に沿う特異的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を妨げる量では内在せず、前記基質-薬剤複合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1及び第2の注射液を含むことを特徴とする製剤。

21. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングする

ための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、但し、前記抗体は、その標的部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在しない、

前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

22. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強

剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項21に記載のキット。

23. 前記抗体-酵素接合体がさらに、放射性同位元素もしくは核磁気共鳴画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

24. 前記基質-薬剤接合体がさらに、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている、請求項21に記載のキット。

25. 段階(a)で提供される前記抗体-酵素接合体が、標的部位に存在する前記抗原に対して特異的な第1の結合部位と、酵素活性を妨害しない、前記酵素上のエピトープに対して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位で前記酵素に非共有的に結合されて前記抗体-酵素接合体を形成する、請求項1に記載の方法。

26. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤であって、

(a) 医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解された、

ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌注射剤、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在せず、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1と第2の注射剤を含むことを特徴とする製剤。

27. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、請求項25記載の抗体-酵素接合体を含有する第1の滅菌容器、並び

に、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含有する第2の滅菌容器、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-薬剤接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在しない、前記第1および第2の容器を含むことを特徴とするキット。

28. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒素、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項27に記載のキット。

29. 診断剤または治療剤を標的部位にターゲティングする方法であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、

酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ二重特異性抗体または抗体フラグメントを提供する段階、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に経口的に注入する段階、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが標的部位に局在し、かつ、その哺乳動物の循環系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記局在化抗体が前記酵素に結合して前記抗体-酵素接合体をその場で形成するように、前記酵素の酵素活性有効量を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、

(d) さらに、前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記産物は前記標的部位に蓄積して有効な治療または診断を可能となし、また、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含む、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に關して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、前記哺乳動物において、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非

標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在しない、前記段階を包含することを特徴とする方法。

30. 前記抗体-酵素接合体中の抗体または抗体フラグメントが、腫瘍、感染もしくは寄生病巣、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性肥満、または、傷害を受けた正常細胞の損傷関連部位、によって産生されるかまたは関連する抗原に特異的に結合する、請求項29に記載の方法。

31. 前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、または、エステラーゼである請求項29に記載の方法。

32. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1個のホウ素付加因子、高物、毒薬、放射性同位元素、核磁気共鳴造影増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光増感剤である、請求項29に記載の方法。

33. 前記酵素が、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリシン塩体を含み、この塩体に、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この塩体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デ

キストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている、請求項29に記載の方法。

34. 前記哺乳動物がヒトである、請求項29に記載の方法。

35. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射製剤であって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含む第1の滅菌注射液、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含む第2の滅菌注射液、但し、前記酵素は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤接合体を含む第3の滅菌注射液、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成し、前記基質-薬剤接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含

み、前記基質-酵素接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、

ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に關して同様の活性を持つ酵素のいずれもが、ヒトにおいて、前記基質-薬剤接合体の投与経路または生体内分布経路に沿う非標的部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を防げる量では内在せず、また、前記基質-薬剤接合体は、医薬的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、前記第1、第2および第3の注射液を含むことを特徴とする製剤。

36. 標的部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの診断または治療に使用するためのキットであって、

(a) 標的部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含む第1の滅菌容器、

(b) 前記標的部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含む第2の滅菌容器、並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-薬剤

37. 前記治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加因子、薬物、毒薬、放射性同位元素、核磁気共鳴画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線増感剤、または、光感増感剤である、請求項36に記載のキット。

Form PC 1.1-B-2 10 required except where noted 1000

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成9年(1997)10月14日

【公表番号】特表平5-501543

【公表日】平成5年(1993)3月25日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-508109

【国際特許分類第6版】

A61K 39/395  
 45/00  
 49/00  
 51/00 ADU

【F I】

A61K 39/395 C 9284-4C  
 45/00 8615-4C  
 49/00 A 9454-4C  
 43/00 ADU 8615-4C

## 手続補正書

平成8年11月20日

特許庁長官 荒井 秀 光 殿

1. 事件の表示 平成2年特許第508109号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ノムノメダイナミクス・インコ・ホレノアツド

3. 代理人 東京都港区新市1丁目1番14号 山田ビル

(郵便番号 160) 電話(03)3361-8023

(6200) 代理人 川 口 義 雄

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により補正する請求項の範囲

6. 補正の対象 明細書及び請求の範囲

## 7. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙の通り補正する。

(2) 明細書中、第6頁第1行～第7頁第1行目に「本発明は……キットを提供する。」とあるを下記の通り補正する。

「前記方法の1つの実施態様において、抗体-酵素複合体中の抗体は、腫瘍、感染もしくは寄生病、フィブリン凝血、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性癌の診断関連部位、または、傷害を受けた正常細胞の標的関連部位によって産生されるかまたはそれらに関連する抗原に特異的に結合する。別の実施態様において、抗体-酵素複合体中の前記酵素は、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルクロニダーゼ、ペクター、ラクタマーゼ、エステラーゼ、デキストラーゼ、または、セルラーゼである。

前記方法の別の実施態様において、薬剤は放射線、例えば 10-500 keV エネルギー範囲で放射線するガンマ放射線の放射性同位元素である。前記薬剤が、電磁共鳴波増強用の電磁性イオンであってもよい。

前記方法の別の実施態様において、薬剤は放射線、例えばペクターもしくはアルファ放射線の放射性同位元素、薬物、毒物、ホウ素化合物、重金属化合物、サイトカイン、光増感剤、または、放射線増感剤である。

前記方法の別の実施態様において、前記非経口注入は、体内、静脈内、動脈内、腹腔内、硬膜内、リンパ管内、筋肉内、皮下、または、カテーテル導管経路によって実施される。

前記方法の別の実施態様において、薬剤が高分子量化合物、例えば前記薬剤のグルクロニド複合体または前記薬剤のポリマー複合体、デキストラン、アミノデキストラン、カルボキシメチルセルロース、または、ポリペプチドである。前記薬剤がポリマーである場合、前記薬剤は、デキストラーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-薬剤複合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン塩を含む。この塩は、少なくとも1つの前記薬剤分子またはイオンが結合されており、さらに、この塩が、前記薬剤の高量である少なくとも1つの可溶性デキストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている。前記薬剤が基質-薬剤複合体である場合、前記基質-薬剤複合体は非基



質性ポリマーを含み、このポリマーに、少なくとも1つの基質オリゴマーが結合され、このオリゴマーに、少なくとも1つの前記要素分子またはイオンが結合されている。

前記方法の別の実施態様において、標識系からの抗体-酵素接合体のクリアランスまたは阻害部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記抗体-酵素接合体はさらに、放射性同位元素もしくは超微細画像増強剤に結合されているか、または標識のために改変されている。前記系からの基質-酵素接合体のクリアランスまたは阻害部位におけるその接合体の局在をモニターするために、前記基質-酵素接合体はさらに、放射性同位元素、超微細画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている。

本発明は標識部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの臓器または治療に使用するためのキットに係り、前記キットは

(a) 標識部位に局在させるために、かつ、前記部位に酵素活性を提供するために有効な量の抗体-酵素接合体を含む第1の滅菌注射剤、但し、前記抗体は、その標識部位に存在する少なくとも1つの抗原と反応性である、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-酵素接合体を含む第2の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-酵素接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれかが、哺乳動物において、前記基質-酵素接合体の投与経路または生体内分布経路に相当する部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を助ける量では内在しない。

前記第1および第2の容器を含むことを特徴とする。

前記キットにおける診断剤または治療剤が、少なくとも1つのホウ素付加原子、薬物、毒素、放射性同位元素、超微細画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線感受剤、または、光感受剤である。前記キットにおける別の実施態様において、前記抗体-酵素接合体はさらに、放射性同位元素もしくは超微細画像増強剤に結合されているか、または結合のために改変されている。前記キット

つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-酵素接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれかが、ヒトにおいて、前記基質-酵素接合体の投与経路または生体内分布経路に相当する部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を助ける量では内在しない。前記第1および第2の容器を含むことを特徴とする。

前記キットにおける治療剤または診断剤が、少なくとも1つのホウ素付加原子、薬物、毒素、放射性同位元素、超微細画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線感受剤、または、光感受剤である。

本発明は診断剤または治療剤を標識部位にターゲティングする方法に係り、前記方法は

(a) 標識部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、選択的抗体または抗体フラグメントを提供する段階、

(b) ターゲティングに有効な量の前記抗体または抗体フラグメントを、哺乳動物に鼻腔に投与する段階、

(c) 前記抗体または抗体フラグメントが標識部位に局在し、かつ、その哺乳動物の組織系から実質的に除去されるのに十分な時間が経過した後、前記局在した抗体が前記酵素に結合して前記抗体-酵素接合体をその場で形成するように、前記酵素の酵素活性有効量を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、

(d) さらに、前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-酵素接合体を前記哺乳動物に経口的に注入する段階、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記産物は前記標識部位に局在して有効な治療または診断を可能とし、また、前記基質-酵素接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれかが、前記哺乳動物において、前記基質-酵素接合体の投与経路または生体内分布経路に相当する部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を助ける量では内在しない。前記段階を包含す

る別の実施態様において、前記基質-酵素接合体はさらに、放射性同位元素、超微細画像増強剤、または、その他の標識に結合されているか、または結合のために改変されている。

前記方法の別の実施態様において、段階(a)で提供される前記抗体-酵素接合体は、標識部位に存在する前記抗原に對して特異的な第1の結合部位と、酵素活性を切さない、前記酵素上のニヒトープに對して特異的な第2の結合部位とをもつ二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントを含み、前記二重特異性抗体もしくは抗体フラグメントが、前記第2の結合部位で前記酵素に非特異的に結合されて前記抗体-酵素接合体を形成する。

本発明は標識部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤に係り、前記滅菌注射剤は

(a) 既定的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解された、ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、抗体-酵素接合体を含む第1の滅菌注射剤、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-酵素接合体を含む第2の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成することが可能であり、前記基質-酵素接合体は、少なくとも1つの診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に對して同様の活性を持つ酵素のいずれかが、ヒトにおいて、前記基質-酵素接合体の投与経路または生体内分布経路に相当する部位に、前記薬剤のターゲティングおよび蓄積を助ける量では内在せず、前記基質-酵素接合体は、既定的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている。前記第1と第2の注射剤を含むことを特徴とする。

本発明は標識部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトの臓器または治療に使用するためのキットに係り、前記キットは

(a) ターゲティングおよび酵素活性に有効な量の、抗体-酵素接合体を含む第1の滅菌注射剤、並びに、

(b) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-酵素接合体を含む第2の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1

ることを特徴とする。この方法の抗体-酵素接合体中の抗体または抗体フラグメントが、腫瘍、感染もしくは炎症病巣、フィブリン凝塊、心筋梗塞、動脈硬化プラーク、非癌性細胞、または、傷害を受けた正常細胞の損傷関連部位、によって産生されるかまたは関連する状況に特異的に結合する。別の実施態様において、前記抗体-酵素接合体中の酵素が、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、グルコニダーゼ、ペクター、ラクタターゼ、または、エステラーゼであり、前記治療剤または診断剤は、少なくとも1個のホウ素付加原子、薬物、毒素、放射性同位元素、超微細画像増強剤、血管拡張剤、サイトカイン、放射線感受剤、または、光感受剤である。前記酵素は、デキストラナーゼまたはセルラーゼであり、ここに、前記基質-酵素接合体が、非基質性アミノデキストランまたはポリリジン抗体を含み、この抗体に、少なくとも1つの前記要素分子またはイオンが結合されており、さらに、この抗体が、前記酵素の基質である少なくとも1つの可溶性デキストランまたはカルボキシメチルセルロースオリゴマーに結合されている。

本発明は標識部位に治療剤または診断剤をターゲティングするための、ヒトに使用するための滅菌注射剤に係り、前記滅菌注射剤は、

(a) 標識部位に存在する抗原に特異的な第1の結合部位と、酵素に対して特異的な第2の結合部位とを持つ、ターゲティングに有効な量の二重特異性抗体または抗体フラグメントを含む第1の滅菌注射剤、但し、前記抗体または抗体フラグメントは、既定的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；

(b) 前記標識部位における酵素活性に有効な量の前記酵素を含む第2の滅菌注射剤、但し、前記酵素は、既定的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている；並びに、

(c) 前記部位に付着するのに有効な量の可溶性基質-酵素接合体を含む第3の滅菌注射剤、但し、前記接合体は前記酵素によって変換されて少なくとも1つの診断剤または治療剤を含む産物を形成し、前記基質-酵素接合体は、少なくとも1つの前記診断剤または治療剤に結合した、前記酵素の基質を含み、前記基質-酵素接合体は、既定的に受容可能な滅菌注射用ベヒクルに溶解されている、ここに、前記酵素および、前記基質-酵素接合体に関して同様の活性を持つ酵素のいずれかが、ヒトにおいて、前記基質-酵素接合体の投与経路または生体内分

